This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07K 16/00 | A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/57150**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01350

(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Mai 1999 (05.05.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 19 846.9 5. Mai 1998 (05.05.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D–69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz–von–Briesen–Strasse 10, D–69151 Neckargemünd (DE). KIPRIYANOV, Sergej [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3, D–69121 Heidelberg (DE).

(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D–81825 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: MULTIVALENT ANTIBODY CONSTRUCTS

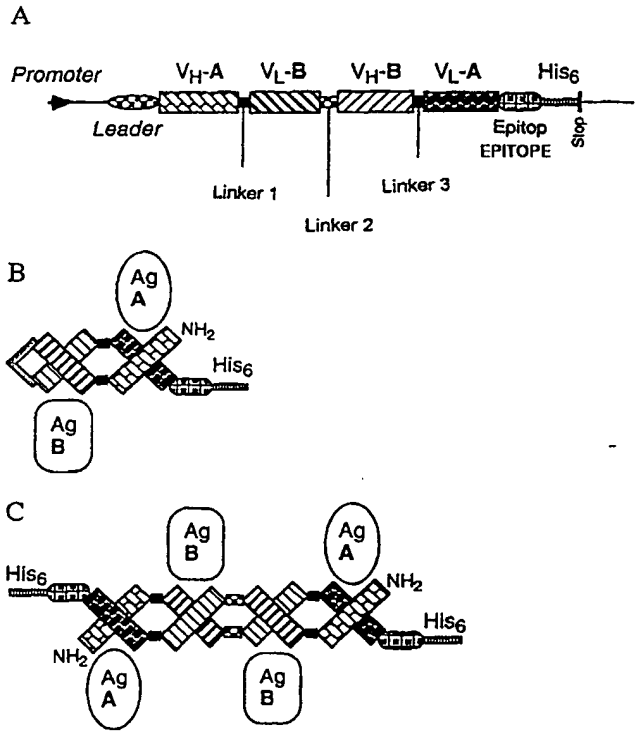
(54) Bezeichnung: MULTIVALENTE ANTIKÖRPER–KONSTRUKTE

(57) Abstract

The invention relates to a multivalent F_v antibody construct comprising at least four variable domains which are connected to one another via peptide linkers 1, 2 and 3. The invention also relates to expression plasmids which code for such an F_v antibody construct. In addition, the invention relates to a method for producing the F_v antibody constructs and to the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F_v–Antikörper–Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F_v–Antikörper–Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v–Antikörper–Konstrukte sowie deren Verwendung.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Multivalente Antikörper-Konstrukte

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente F_v-Antikörper-Konstrukte, sie kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v-Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei V_H- und zwei V_L-Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V_H- und einer V_L-Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit F_v-Antikörper-Konstruten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß F_v-Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke

einsetzbar macht.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines F_v-Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10 - 30 Aminosäuren aufweist. Des weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v-Antikörper-Konstrukt mit anderen F_v-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d.h. multivalentes, F_v-Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das F_v-Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck "F_v-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen F_v-Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige F_v-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzel-

kettigen F_v-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein F_v-Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das F_v-Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d.h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d.h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0 - 10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem NH_2-Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3 -10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v-Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen F_v-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11 - 20 Aminosäuren, insbesondere 15 - 20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz $(G_4S)_4$, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

Ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1 - 6 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke "F_v-Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3x19-LL, pDISC3x19-SL, pPIC-DISC-LL, pPIC-DISC-SL, pDISC5-LL und pDISC6-SL. Die ersteren vier wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

(a) ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt, und/oder
(b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
(c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße F_v-Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden.

Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F_v-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His_6: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 2 zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird, His_6: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (PelB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β-Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt *lac*-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein $(Gly_4Ser)_4$-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für β--

Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt *lac*-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 5 zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDIS3x19-LL kodierten bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 6 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3x19-SL kodierten tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 7 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des

Saccharomyces cerevisiae-α-Faktor-Sekretionssignals; V_H: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 8 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente F_v-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*-α-Faktor-Sekretionssignals; V_H: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 9 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC5-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β-Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; hok-sok: Plasmid-stabilisierender DNA-Locus; LacI: Gen, das für den Lac-Repressor kodiert; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; LacZ': Gen, das für das α-Peptid von ß-Galactosidase kodiert; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein $(Gly_4Ser)_4$-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; M13 IG: intergenische Region des Bakteriophagen M13; pBR322ori: Ursprung der DNA-Replikation; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle, die von dem E. coli lacZ Gen (lacZ), von dem Bakteriophagen T7 Gen 10 (T7g10) oder von dem E. coli skp Gen (skp) stammt; skp: Gen, das für den bakteriellen periplasmatischen Faktor Skp/OmpH kodiert; tHP: starker Transkriptions-Terminator; tlPP: Transkriptions-Terminator; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 10 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC6-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für β-Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; hok-sok: Plasmid-stabilisierender DNA-Locus; LacI: Gen, das für den Lac-Re-

pressor kodiert; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; LacZ': Gen, das für das α-Peptid von ß-Galactosidase kodiert; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; M13 IG: intergenische Region des Bakteriophagen M13; pBR322ori: Ursprung der DNA-Replikation; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle, die von dem E. coli lacZ Gen (lacZ), von dem Bakteriophagen T7 Gen 10 (T7g10) oder von dem E. coli skp Gen (skp) stammt; skp: Gen, das für den bakteriellen periplasmatischen Faktor Skp/OmpH kodiert; tHP: starker Transkriptions-Terminator; tlPP: Transkriptions-Terminator; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Bakterien

Die Plasmide pHOG-αCD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente kodieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov *et al.*, 1996, *J. Immunol. Meth.* 196, 51-62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov *et al.*, 1997, *Protein Eng.* 10, 445-453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F_v-Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V_H-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GlyGly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCA-CACAGAATTCTTAGATCTATTAAAGAGGAGAAATTAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTTGGC, erzeugt (vgl. Fig. 2). Das PCR-Fragment 1 wurde mit *Eco*RI und *Eco*RV gespalten und mit dem mit *Eco*RI/*Eco*RV linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V_L-Domäne von Anti-CD19,

gefolgt von einem Segment, das für ein *c-myc*-Epitop und einen Hexahistidinyl-schwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCACA-CAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAACTCCA, und DP4, 5'-AGCA-CACTCTAGAGACACACAGATCTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGTTTAGG, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit *Hind*III und *Xba*I gespalten und mit dem durch *Hind*III/*Xba*I linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG und entweder Li-1, 5'-TATA-TACTGCAGCTGCACCTGGCTACCACCCAC-CACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCCAGAACCACCACCACC-AGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines langen flexiblen $(Gly_4Ser)_4$-inter-scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATA-TACTGCAGCTGCACCTGCGACCCTGGGCCACCAGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL wurden durch Ligierung des *Ncd*I/*Pvu*II-Restriktionsfragments aus pHOG19-3, umfassend das Vektorgerüst und die *Ncd*I/*Pvu*II-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte sind in den Figuren 5 bzw. 6 angegeben.

Beispiel 2: Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Hefe

(A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

Der Vektor pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cerevi-*

siae α-Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker, Zeocin™, der sowohl in *Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3x19-SL unter Verwendung der Primer 5-PIC, 5'-CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGC, und pSEXBn 5'-GGTCGACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit *Eco*RI und *Xba*I gespalten und in mit *Eco*RI/*Xba*I linearisiertes pPICZαA ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen des tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 7 gezeigt.

(B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3x19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZαA wurde mit *Eco*RI gespalten. Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit *Xba*I gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3x19-LL mit *Nco*I gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit *Xba*I wurde ein kleines Fragment, umfassend ein für den bivalenten F_v-Antikörper kodierendes Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

Beispiel 3: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes in Bakterien

E. coli-XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3x19-LL bzw. pDISC3x19-SL transformiert worden waren, wurden

über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose ($2xYT_{Ga}$) bei 37°C gezüchtet. 1:50-Verdünnungen der Übernachtkulturen in $2xYT_{GA}$ wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD_{600}-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2xYT-Mediums, das 50 µg/ml Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20-22°C) 18-20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1stündigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt, durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu^{2+} beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluenten minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest (1976,

Anal. Biochem., 72, 248-254) unter Verwendung des Bio-Rad(München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden aus den A_{280}-Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten $\epsilon^{1mg/ml}$ = 1,96 bzw. 1,93 bestimmt.

Beispiel 4: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris*

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10 µg Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit *Sad* linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100 µg/ml Zeocin™ enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-*myc*-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert.

Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

Beispiel 5: Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes

(A) Größenausschlußchromatographie

Eine analytische Gelfiltration der F_v-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das

Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200 µl/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

(B) Durchflußzytometrie

Die menschliche $CD3^+/CD19^-$-akute-T-Zell-Leukämielinie Jurkat und die $CD19^+/-CD3^-$-B-Zellinie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5×10^5 Zellen in 50 µl RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggestein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 µl der F_v-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 µl 10 µg/ml anti-c-*myc*-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 µl des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100 µl 1 µg/ml-Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszens der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

(C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zellinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO_2 inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard[^{51}Cr]-Freisetzungstests bewertet; 2×10^6 Zielzellen wurden mit 200 µCi

$Na[^{51}Cr]O_4$ (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von 2 x 10^5/ml resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von 5 x 10^6/ml eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in 100 µl wurden auf 10^4 Zielzellen/Vertiefung in 50 µl titriert. 50 µl Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach angesetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. 100 µl des Überstands wurden gewonnen und auf [^{51}Cr]-Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als: (experimentelle Freisetzung - spontane Freisetzung)/(maximale Freisetzung - spontane Freisetzung) x 100.

Beispiel 6: Konstruktion der Plasmide pDISC5-LL und pDISC6-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Bakterien durch Hoch-Zelldichte-Fermentation

Es wurden Expressionsvektoren hergestellt, die das hok/sok Plasmid-freie Zell-"suicide"-System und ein Gen enthielten, das für den Skp/OmpH periplasmatischen Faktor für eine größere Herstellung rekombinanter Antikörper kodiert. Das skp Gen wurde durch PCR mittels der Primer skp-1, 5'-CGA ATT CTT AAG ATA AGA AGG AGT TTA TTG TGA AAA AGT GGT TAT TAG CTG CAG G und skp-2, 5'-CGA ATT AAG CTT CAT TAT TTA ACC TGT TTC AGT ACG TCG G unter Verwendung des Plasmids pGAH317 (Holck and Kleppe, 1988, Gene 67, 117-124) amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit AflII und HindIII gespalten und in das mit AflII/HindIII linearisierte Plasmid pHKK (Horn et al., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 524-532) inseriert, wodurch der Vektor pSKK erhalten wurde. Die in den Plasmiden pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL enthaltenen und für die scFv-Antikörper-Konstrukte kodierenden Gene wurden durch PCR mittels der Primer fe-

1, 5'-CGA ATT TCT AGA TAA GAA GGA GAA ATT AAC CAT GAA ATA CC und fe-
2, 5'-CGA ATT CTT AAG CTA TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TGA G
amplifiziert. Die XbaI/AflII gespaltenen PCR-Fragmente wurden in pSKK vor dem skp Insert inseriert, wodurch die Expressionsplasmide pDISC5-LL bzw. pDISC6-SL erhalten wurden, die tri-cistronische Operons unter der Kontrolle des lac Promotor/Operator-Systems enthalten (vgl. Fig. 9, 10).

K 2675

Patentansprüche

1. Multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

2. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 0-10 Aminosäuren aufweisen.

3. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die Aminosäuresequenz GG aufweisen.

4. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bivalent ist.

5. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Peptidlinker 2 11-20 Aminosäuren aufweist.

6. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz $(G_4S)_4$ aufweist.

7. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt tetravalent ist.

8. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7, wobei der Peptidlinker 2 3-10 Aminosäuren aufweist.

9. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.

10. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt multispezifisch ist.

11. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 10, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bispezifisch ist.

12. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt monospezifisch ist.

13. Verfahren zur Herstellung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12, wobei für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird.

14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivalente F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-12.

15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-LL.

16. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-SL.

17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-LL.

18. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-SL.

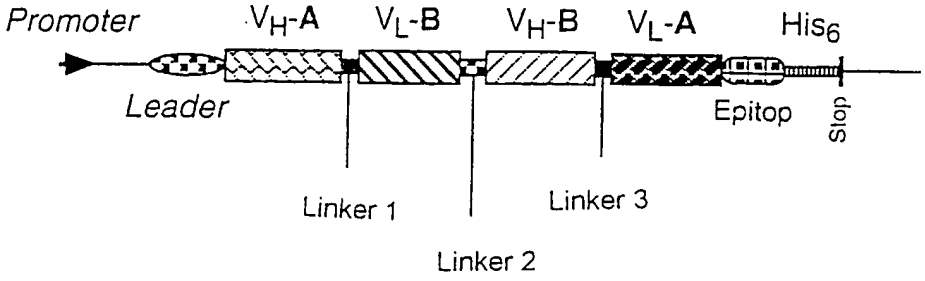
19. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC5-LL.

20. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC6-SL.

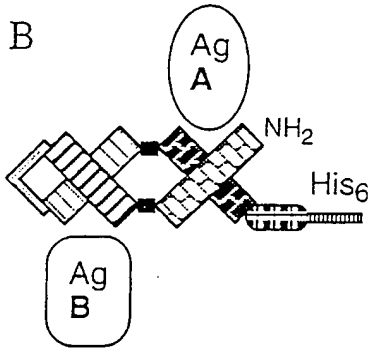
21. Verwendung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind.

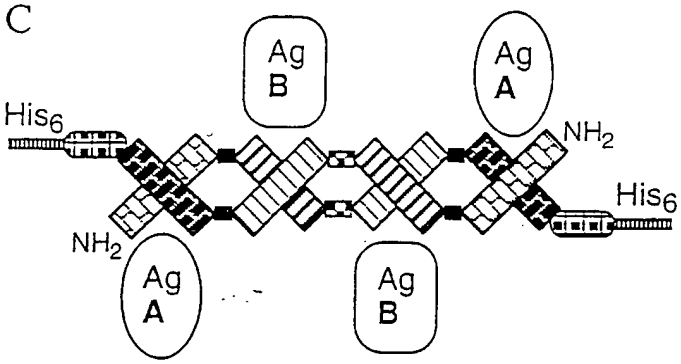
A


Promoter
V_H-A
V_L-B
V_H-B
V_L-A
His_6
Leader
Epitop
Stop
Linker 1
Linker 2
Linker 3

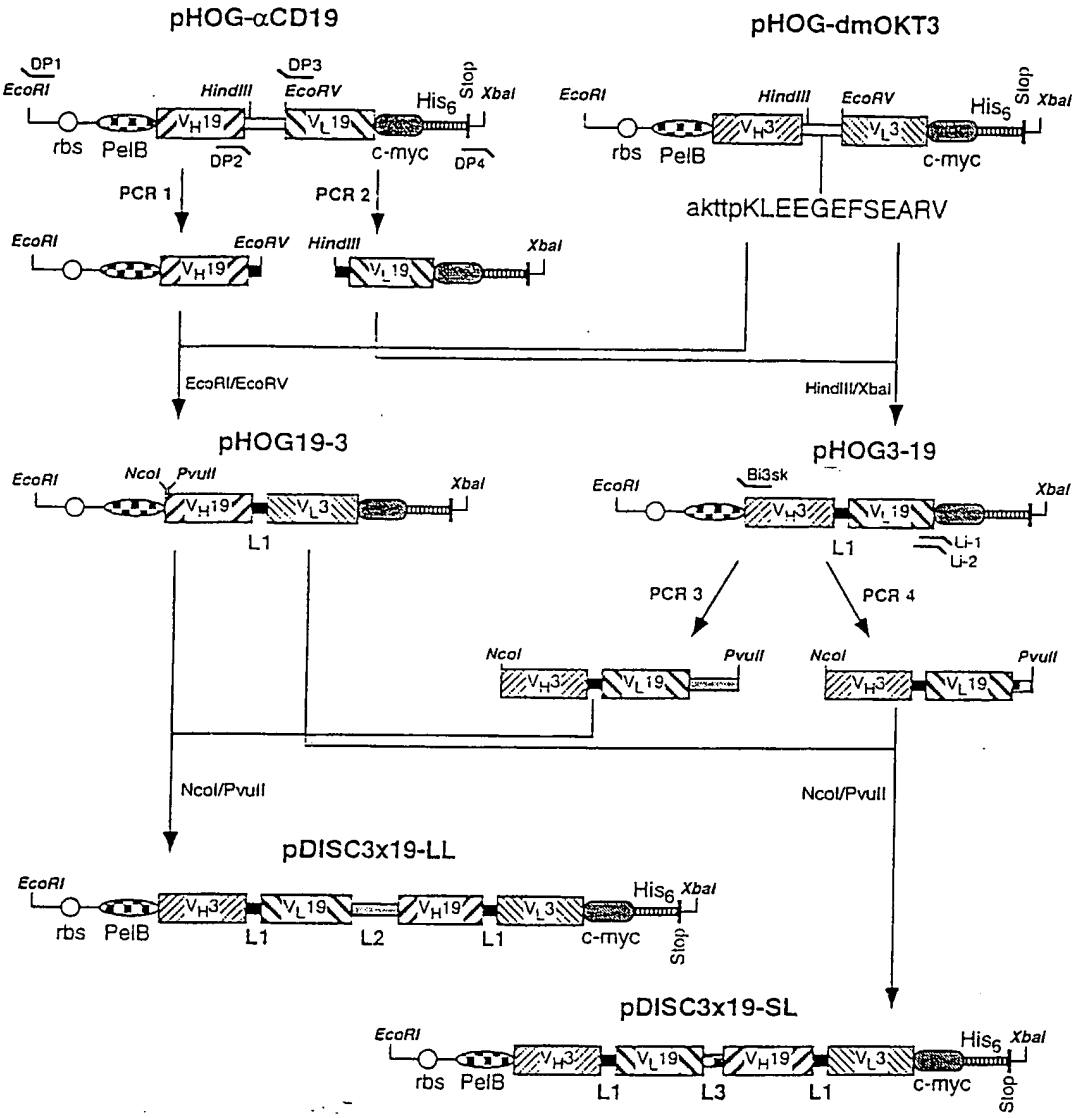
B


Ag A
NH_2
His_6
Ag B

C

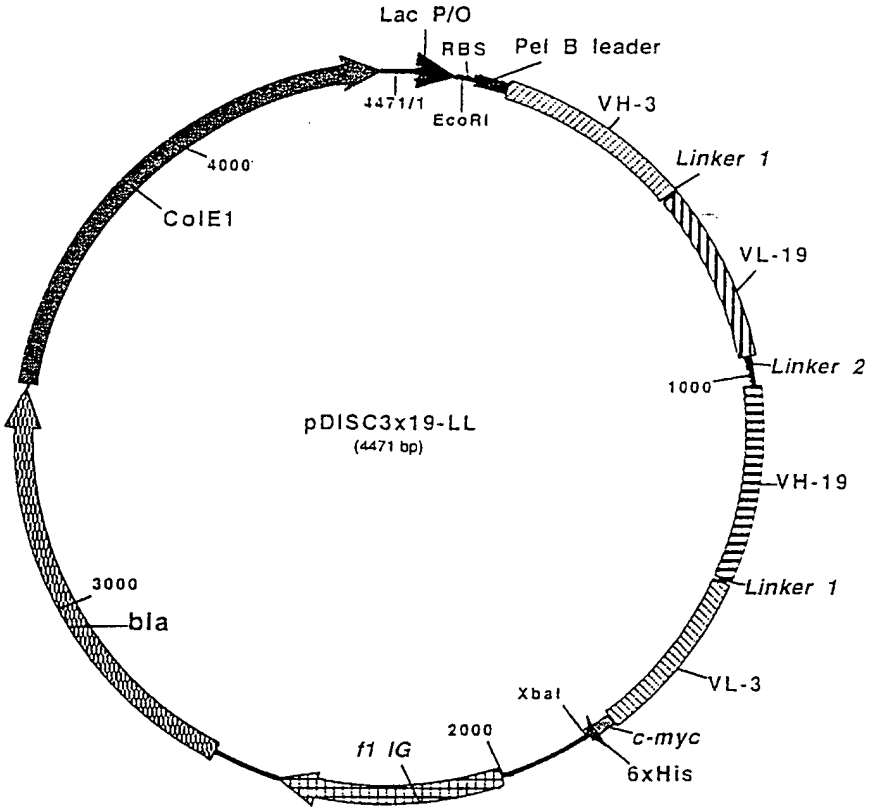

Ag B
Ag A
His_6
NH_2
His_6
NH_2
Ag A
Ag B

FIGUR 1

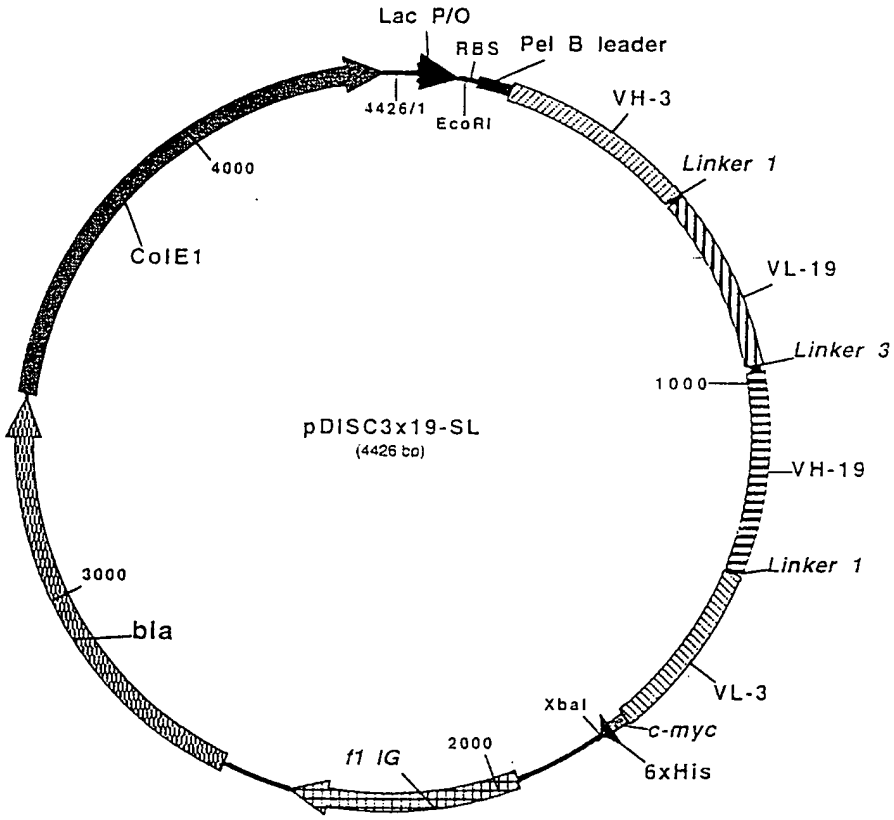


Linkers: L1 = GG
L2 = $(G_4S)_4$
L3 = GGPGS

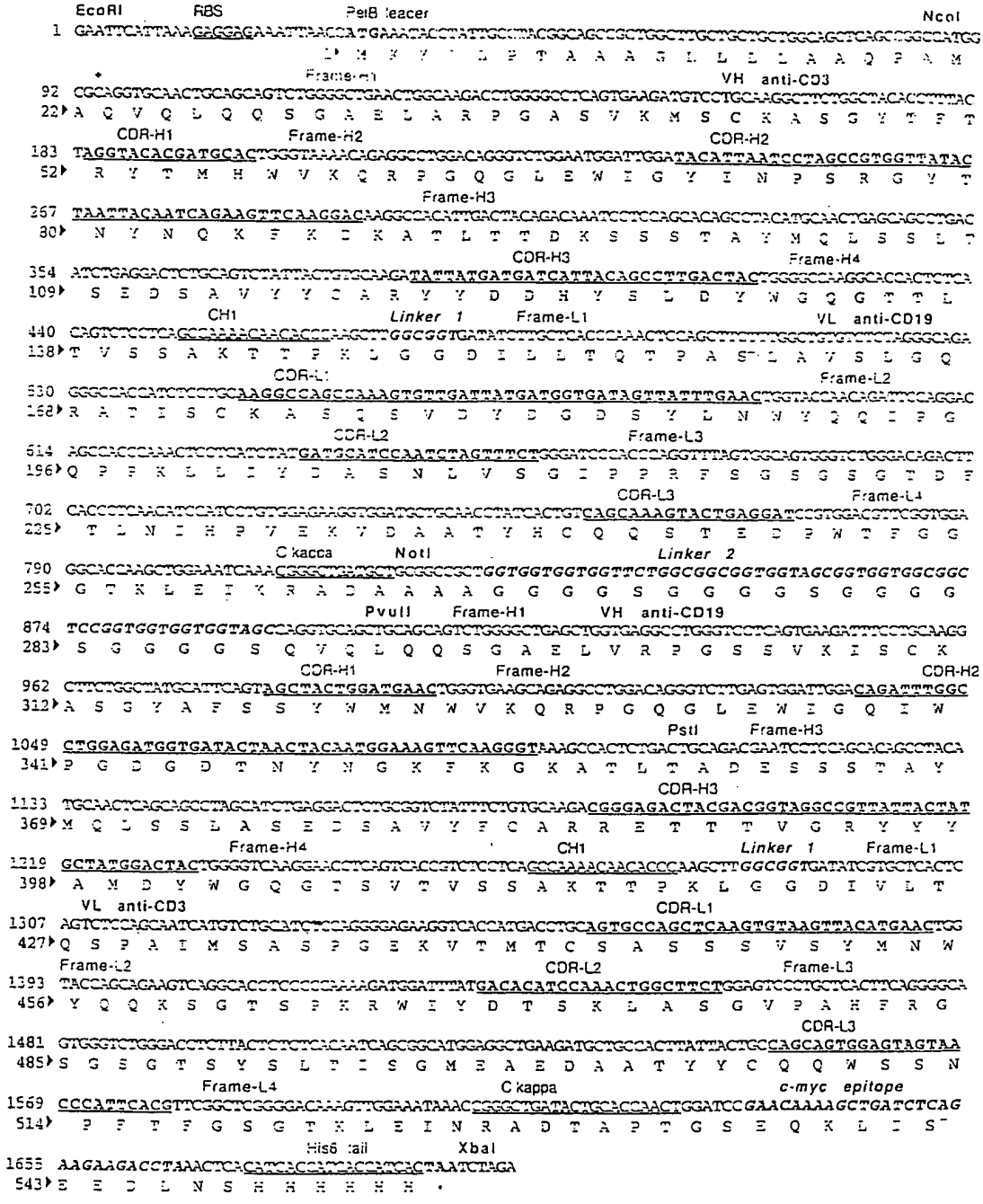
FIGUR 2


Lac P/O
RBS
Pel B leader
4471/1
EcoRI
VH-3
Linker 1
VL-19
Linker 2
1000
VH-19
Linker 1
VL-3
XbaI
c-myc
6xHis
2000
f1 IG
3000
bla
4000
ColE1
pDISC3x19-LL
(4471 bp)

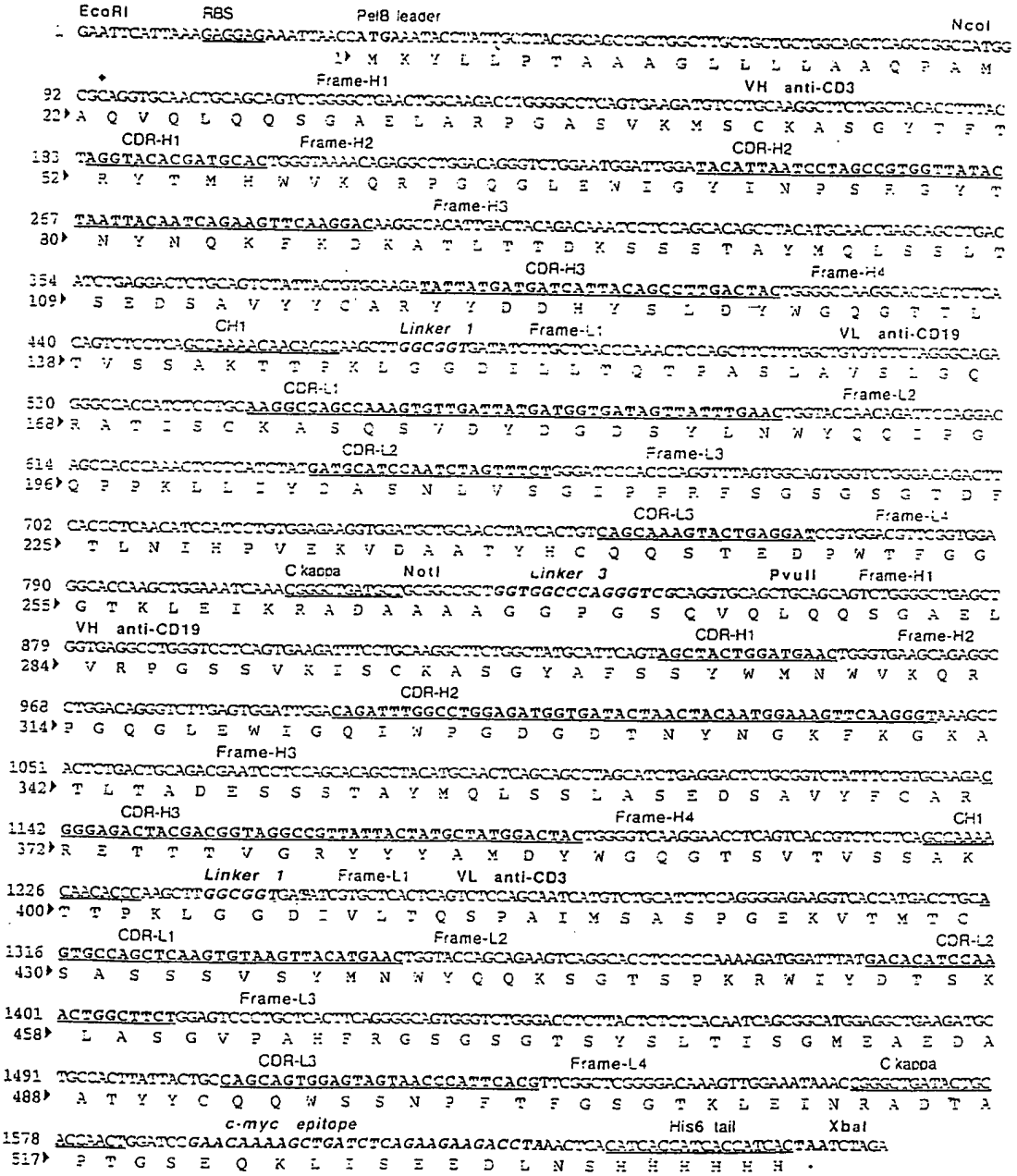
FIGUR 3


Lac P/O
RBS
Pel B leader
VH-3
Linker 1
VL-19
Linker 3
VH-19
Linker 1
VL-3
c-myc
6xHis
XbaI
f1 IG
bla
ColE1
4426/1
EcoRI
4000
3000
2000
1000
pDISC3x19-SL
(4426 bp)

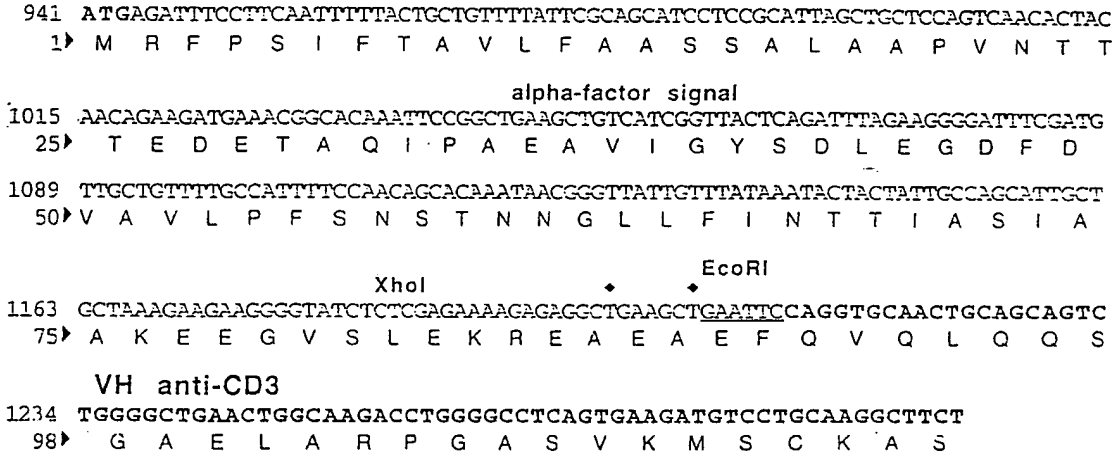
FIGUR 4


EcoRI
RBS
PelB leacer
NcoI
Frame-H1
VH anti-CD3
CDR-H1
Frame-H2
CDR-H2
Frame-H3
CDR-H3
Frame-H4
CH1
Linker 1
Frame-L1
VL anti-CD19
CDR-L1
Frame-L2
CDR-L2
Frame-L3
CDR-L3
Frame-L4
C kacca
NotI
Linker 2
PvuII
Frame-H1
VH anti-CD19
CDR-H1
Frame-H2
CDR-H2
PstI
Frame-H3
CDR-H3
Frame-H4
CH1
Linker 1
Frame-L1
VL anti-CD3
CDR-L1
Frame-L2
CDR-L2
Frame-L3
CDR-L3
Frame-L4
C kappa
c-myc epitope
His6 tail
XbaI

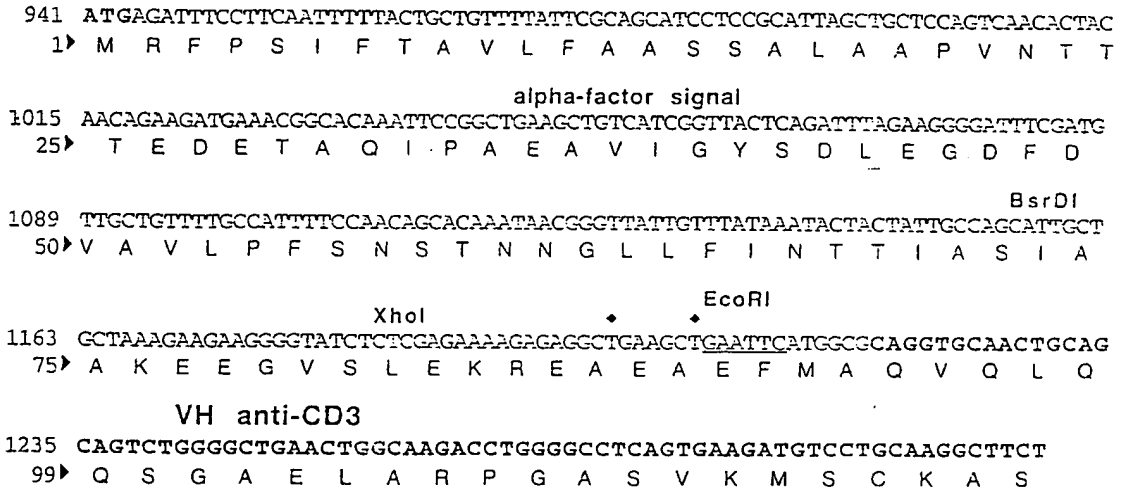
FIGUR 5


EcoRI
RBS
PelB leader
NcoI
Frame-H1
VH anti-CD3
CDR-H1
Frame-H2
CDR-H2
Frame-H3
CDR-H3
Frame-H4
CH1
Linker 1
Frame-L1
VL anti-CD19
CDR-L1
Frame-L2
CDR-L2
Frame-L3
CDR-L3
Frame-L4
C kappa
NotI
Linker 3
PvuII
Frame-H1
VH anti-CD19
CDR-H1
Frame-H2
CDR-H2
Frame-H3
CDR-H3
Frame-H4
CH1
Linker 1
Frame-L1
VL anti-CD3
CDR-L1
Frame-L2
CDR-L2
Frame-L3
CDR-L3
Frame-L4
C kappa
c-myc epitope
His6 tail
XbaI

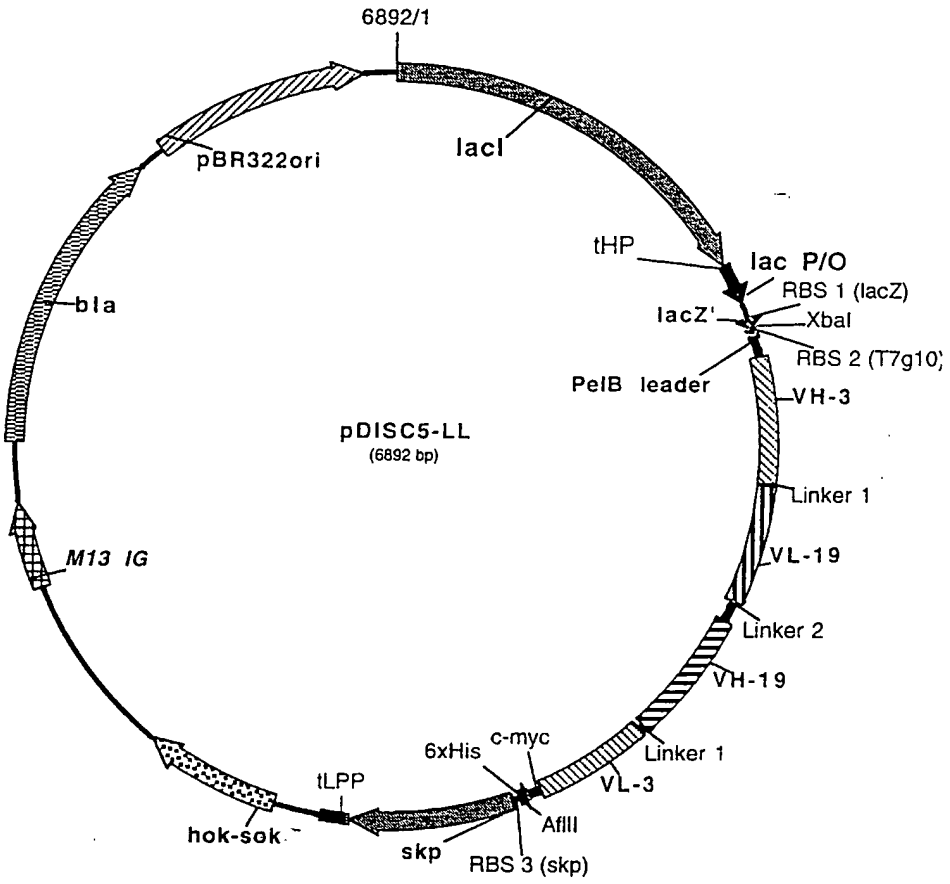
FIGUR 6


941 ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
1 M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T
alpha-factor signal
1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATG
25 T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D
1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
50 V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A
XhoI
EcoRI
1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCCAGGTGCAACTGCAGCAGTC
75 A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S
VH anti-CD3
1234 TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
98 G A E L A R P G A S V K M S C K A S

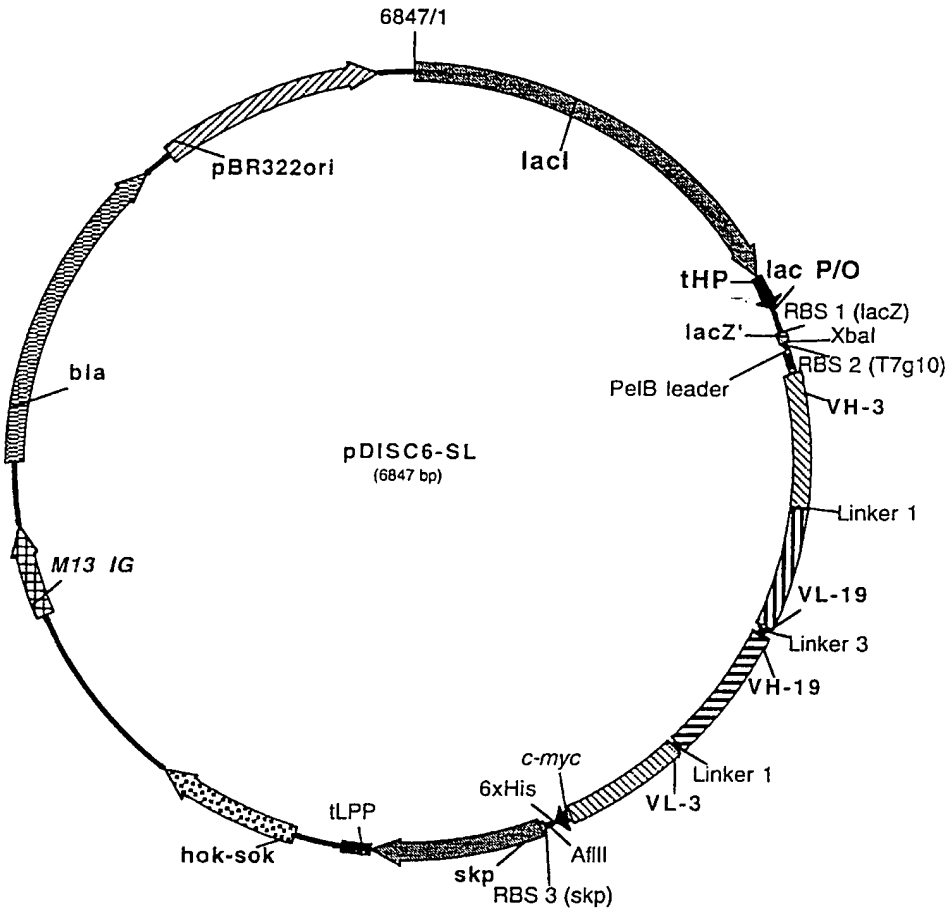
FIGUR 7


941 ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
1 M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T
alpha-factor signal
1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATG
25 T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D
BsrDI
1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
50 V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A
EcoRI
XhoI
1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG
75 A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q
VH anti-CD3
1235 CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
99 Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8


6892/1
lacI
pBR322ori
tHP
lac P/O
RBS 1 (lacZ)
lacZ'
XbaI
RBS 2 (T7g10)
PelB leader
VH-3
bla
pDISC5-LL
(6892 bp)
Linker 1
VL-19
M13 IG
Linker 2
VH-19
6xHis
c-myc
Linker 1
VL-3
tLPP
AflII
hok-sok
skp
RBS 3 (skp)

FIGUR 9


6847/1
lacI
pBR322ori
tHP
lac P/O
RBS 1 (lacZ)
lacZ'
XbaI
RBS 2 (T7g10)
PelB leader
VH-3
bla
pDISC6-SL
(6847 bp)
Linker 1
M13 IG
VL-19
Linker 3
VH-19
c-myc
6xHis
Linker 1
VL-3
tLPP
AflII
hok-sok
skp
RBS 3 (skp)

FIGUR 10

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
(B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
(C) ORT: Heidelberg
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Multivalente Antikoerper-Konstrukte

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 17

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 1698 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:28..1689

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE:28..1689

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
GAATTCATTA AAGAGGAGAA ATTAACC ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA          51
                              Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala
                                1               5
```

```
GCC GCT GGC TTG CTG CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG CAG GTG        99
Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val
     10                  15                  20

CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG       147
Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val
 25                  30                  35                  40

AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC ACG ATG       195
Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met
                 45                  50                  55

CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC       243
His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
             60                  65                  70

ATT AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC       291
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
         75                  80                  85

AAG GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA       339
Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
     90                  95                 100

CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA       387
Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
105                 110                 115                 120

TAT TAT GAT GAT CAT TAC AGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT       435
Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
                125                 130                 135

CTC ACA GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC       483
Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile
            140                 145                 150

TTG CTC ACC CAA ACT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG       531
Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg
        155                 160                 165

GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT       579
Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp
    170                 175                 180

AGT TAT TTG AAC TGG TAC CAA CAG ATT CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC       627
Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
185                 190                 195                 200

CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAT CTA GTT TCT GGG ATC CCA CCC AGG TTT       675
Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe
                205                 210                 215

AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG       723
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val
            220                 225                 230
```

```
GAG AAG GTG GAT GCT GCA ACC TAT CAC TGT CAG CAA AGT ACT GAG GAT        771
Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp
        235                 240                 245

CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCT GAT        819
Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp
    250                 255                 260

GCT GCG GCC GCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGT GGT AGC GGT GGT        867
Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
265                 270                 275                 280

GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGT AGC CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG        915
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
                285                 290                 295

GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG TCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT        963
Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala
            300                 305                 310

TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG       1011
Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg
        315                 320                 325

CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CAG ATT TGG CCT GGA GAT GGT       1059
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly
    330                 335                 340

GAT ACT AAC TAC AAT GGA AAG TTC AAG GGT AAA GCC ACT CTG ACT GCA       1107
Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
345                 350                 355                 360

GAC GAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTA GCA TCT       1155
Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser
                365                 370                 375

GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGG GAG ACT ACG ACG GTA       1203
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val
            380                 385                 390

GGC CGT TAT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC       1251
Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
        395                 400                 405

ACC GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC GTG       1299
Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val
    410                 415                 420

CTC ACT CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC       1347
Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
425                 430                 435                 440

ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG AAC TGG TAC       1395
Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
                445                 450                 455
```

```
CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC      1443
Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
            460                 465                 470

AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CAC TTC AGG GGC AGT GGG TCT GGG      1491
Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly
        475                 480                 485

ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC GGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC      1539
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
    490                 495                 500

ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG      1587
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser
505                 510                 515                 520

GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAC CGG GCT GAT ACT GCA CCA ACT GGA TCC      1635
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser
                525                 530                 535

GAA CAA AAG CTG ATC TCA GAA GAA GAC CTA AAC TCA CAT CAC CAT CAC      1683
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His His
            540                 545                 550

CAT CAC TAATCTAGA                                                   1698
His His
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 554 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1               5                  10                  15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
            20                  25                  30

Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
        35                  40                  45

Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
    50                  55                  60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr
65                  70                  75                  80
```

```
Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys
                 85                  90                  95

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
            100                 105                 110

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu
        115                 120                 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
    130                 135                 140

Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser
145                 150                 155                 160

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser
                165                 170                 175

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
            180                 185                 190

Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu
        195                 200                 205

Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
    210                 215                 220

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr
225                 230                 235                 240

His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
                245                 250                 255

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
    290                 295                 300

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
305                 310                 315                 320

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
                325                 330                 335

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
            340                 345                 350

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
        355                 360                 365
```

```
Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
    370                 375                 380

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
385                 390                 395                 400

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
                405                 410                 415

Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
            420                 425                 430

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser
        435                 440                 445

Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro
    450                 455                 460

Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
465                 470                 475                 480

His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
                485                 490                 495

Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
            500                 505                 510

Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
        515                 520                 525

Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
    530                 535                 540

Asp Leu Asn Ser His His His His His His
545                 550
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 1653 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:28..1644

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE:28..1644

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```
GAATTCATTA AAGAGGAGAA ATTAACC ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA          51
                              Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala
                                1               5

GCC GCT GGC TTG CTG CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG CAG GTG         99
Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val
     10                  15                  20

CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG        147
Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val
 25                  30                  35                  40

AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC ACG ATG        195
Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met
                 45                  50                  55

CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC        243
His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
             60                  65                  70

ATT AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC        291
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
         75                  80                  85

AAG GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA        339
Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
     90                  95                  100

CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA        387
Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
105                 110                 115                 120

TAT TAT GAT GAT CAT TAC AGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT        435
Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
                125                 130                 135

CTC ACA GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC        483
Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile
            140                 145                 150

TTG CTC ACC CAA ACT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG        531
Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg
        155                 160                 165

GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT        579
Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp
    170                 175                 180
```

```
AGT TAT TTG AAC TGG TAC CAA CAG ATT CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC      627
Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
185                 190                 195                 200

CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAT CTA GTT TCT GGG ATC CCA CCC AGG TTT      675
Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe
                205                 210                 215

AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG      723
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val
            220                 225                 230

GAG AAG GTG GAT GCT GCA ACC TAT CAC TGT CAG CAA AGT ACT GAG GAT      771
Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp
        235                 240                 245

CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCT GAT      819
Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp
    250                 255                 260

GCT GCG GCC GCT GGT GGC CCA GGG TCG CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT      867
Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
265                 270                 275                 280

GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG TCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG      915
Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
                285                 290                 295

GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG      963
Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln
            300                 305                 310

AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CAG ATT TGG CCT GGA GAT     1011
Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp
        315                 320                 325

GGT GAT ACT AAC TAC AAT GGA AAG TTC AAG GGT AAA GCC ACT CTG ACT     1059
Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
    330                 335                 340

GCA GAC GAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTA GCA     1107
Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala
345                 350                 355                 360

TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGG GAG ACT ACG ACG     1155
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr
                365                 370                 375

GTA GGC CGT TAT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA     1203
Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
            380                 385                 390

GTC ACC GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC     1251
Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile
        395                 400                 405
```

```
GTG CTC ACT CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG      1299
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
    410                 415                 420

GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG AAC TGG      1347
Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp
425                 430                 435                 440

TAC CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA      1395
Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr
                445                 450                 455

TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CAC TTC AGG GGC AGT GGG TCT      1443
Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser
            460                 465                 470

GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC GGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT      1491
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala
        475                 480                 485

GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA TTC ACG TTC GGC      1539
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly
    490                 495                 500

TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAC CGG GCT GAT ACT GCA CCA ACT GGA      1587
Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly
505                 510                 515                 520

TCC GAA CAA AAG CTG ATC TCA GAA GAA GAC CTA AAC TCA CAT CAC CAT      1635
Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His
                525                 530                 535

CAC CAT CAC TAATCTAGA                                               1653
His His His
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 539 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

```
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1               5                  10                  15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
            20                  25                  30

Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
        35                  40                  45
```

```
Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
 50                  55                  60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr
65                  70                  75                  80

Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys
                85                  90                  95

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
            100                 105                 110

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu
        115                 120                 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
    130                 135                 140

Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser
145                 150                 155                 160

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser
                165                 170                 175

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
            180                 185                 190

Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu
        195                 200                 205

Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
    210                 215                 220

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr
225                 230                 235                 240

His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
                245                 250                 255

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly
            260                 265                 270

Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
        275                 280                 285

Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser
    290                 295                 300

Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
305                 310                 315                 320

Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys
                325                 330                 335
```

```
Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala
            340                 345                 350

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
        355                 360                 365

Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met
    370                 375                 380

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
385                 390                 395                 400

Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
                405                 410                 415

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
            420                 425                 430

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
        435                 440                 445

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
    450                 455                 460

Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
465                 470                 475                 480

Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
                485                 490                 495

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
            500                 505                 510

Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
        515                 520                 525

Glu Asp Leu Asn Ser His His His His His His
    530                 535
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 57 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TATATACTGC AGCTGCACCT GCGACCCTGG GCCACCAGCG GCCGCAGCAT CAGCCCG 57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 45 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CCGTGAATTC CAGGTGCAAC TGCAGCAGTC TGGGGCTGAA CTGGC 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GGTCGACGTT AACCGACAAA CAACAGATAA AACG 34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 348 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:1..348

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE:1..348

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

```
ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC        48
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1               5                  10                  15

GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA        96
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
            20                  25                  30

ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC       144
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
        35                  40                  45

GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG       192
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
    50                  55                  60

TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA       240
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65                  70                  75                  80

TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAA TTC CAG GTG CAA CTG CAG       288
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Gln Val Gln Leu Gln
                85                  90                  95

CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG TCC       336
Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser
            100                 105                 110

TGC AAG GCT TCT                                                      348
Cys Lys Ala Ser
        115
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 116 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

```
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1               5                  10                  15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
            20                  25                  30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
        35                  40                  45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
    50                  55                  60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65                  70                  75                  80

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Gln Val Gln Leu Gln
                85                  90                  95

Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser
            100                 105                 110

Cys Lys Ala Ser
        115
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 354 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:1..354

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE:1..354

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

```
ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC        48
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1               5                  10                  15

GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA        96
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
            20                  25                  30

ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC       144
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
        35                  40                  45

GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG       192
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
    50                  55                  60

TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA       240
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65                  70                  75                  80

TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAA TTC ATG GCG CAG GTG CAA       288
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ala Gln Val Gln
                85                  90                  95

CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG       336
Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
            100                 105                 110

ATG TCC TGC AAG GCT TCT                                              354
Met Ser Cys Lys Ala Ser
        115
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 118 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

```
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1               5                  10                  15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
            20                  25                  30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
        35                  40                  45
```

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ala Gln Val Gln
85 90 95

Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
100 105 110

Met Ser Cys Lys Ala Ser
115

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 42 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

TCACACAGAA TTCTTAGATC TATTAAAGAG GAGAAATTAA CC 42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 40 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

AGCACACGAT ATCACCGCCA AGCTTGGGTG TTGTTTTGGC 40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 43 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

AGCACACAAG CTTGGCGGTG ATATCTTGCT CACCCAAACT CCA 43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 57 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

AGCACACTCT AGAGACACAC AGATCTTTAG TGATGGTGAT GGTGATGTGA GTTTAGG 57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 33 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CAGCCGGCCA TGGCGCAGGT GCAACTGCAG CAG 33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 102 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TATATACTGC AGCTGCACCT GGCTACCACC ACCACCGGAG CCGCCACCAC CGCTACCACC 60

GCCGCCAGAA CCACCACCAC CAGCGGCCGC AGCATCAGCC CG 102

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C07K 16/00 16/28, C12N 15/63, A61K 39/395, G01N 33/53

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/57150**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01350

(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Mai 1999 (05.05.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 19 846.9 5. Mai 1998 (05.05.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von-Briesen-Strasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE). KIPRIYANOV, Sergej [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3, D-69121 Heidelberg (DE).

(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 22. Juni 2000 (22.06.00)

(54) Title: MULTIVALENT ANTIBODY CONSTRUCTS

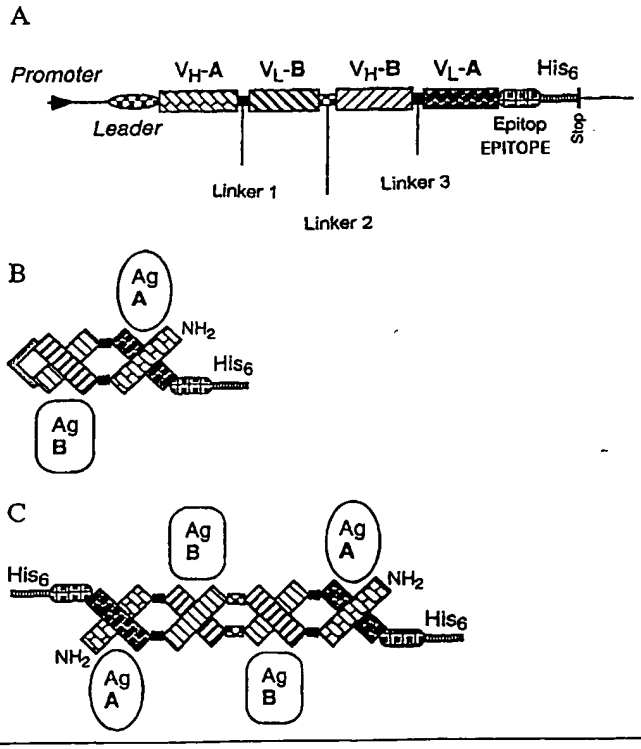
(54) Bezeichnung: MULTIVALENTE ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE

(57) Abstract

The invention relates to a multivalent F_v antibody construct comprising at least four variable domains which are connected to one another via peptide linkers 1, 2 and 3. The invention also relates to expression plasmids which code for such an F_v antibody construct. In addition, the invention relates to a method for producing the F_v antibody constructs and to the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F_v-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No
PCT/DE 99/01350

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K16/00 C07K16/28 C12N15/63 A61K39/395 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GRUBER M ET AL: "Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in Escherichia coli." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1994 JUN 1) 152 (11) 5368-74. , XP000872832 the whole document ---	1,4, 10-14, 21,22
X	MACK M ET AL: "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1995 JUL 18) 92 (15) 7021-5. , XP000566333 the whole document ---	1,2,4, 10-14, 21,22

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 February 2000	17.03.00

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Mennessier, T

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter ...nal Application No
PCT/DE 99/01350

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KURUCZ I ET AL: "Retargeting of CTL by an efficiently refolded bispecific single-chain Fv dimer produced in bacteria." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1995 MAY 1) 154 (9) 4576-82. , XP000872833 the whole document ---	1,4,5, 10-14, 21,22
X	DE JONGE J ET AL: "Production and characterization of bispecific single-chain antibody fragments." MOLECULAR IMMUNOLOGY, (1995 DEC) 32 (17-18) 1405-12. , XP000872314 the whole document ---	1,4,5, 10-14, 21,22
A	COLOMA M J ET AL: "Design and production of novel tetravalent bispecific antibodie [see comments]." NATURE BIOTECHNOLOGY, (1997 FEB) 15 (2) 159-63. , XP000647731 page 159 -page 160 ---	1-22
T	KIPRIYANOV S M ET AL: "Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, (1999 OCT 15) 293 (1) 41-56. , XP002131382 the whole document -----	1-22

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 99/01350

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210

2. [] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Field I.1

Although Claims Nos. 21 and 22 relate to a diagnostic method which is conducted on the human/animal body or to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the multivalent Fv antibody construct.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte onales Aktenzeichen
PCT/DE 99/01350

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K16/00 C07K16/28 C12N15/63 A61K39/395 G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GRUBER M ET AL: "Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in Escherichia coli." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1994 JUN 1) 152 (11) 5368-74. , XP000872832 das ganze Dokument	1,4, 10-14, 21,22
X	MACK M ET AL: "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1995 JUL 18) 92 (15) 7021-5. , XP000566333 das ganze Dokument	1,2,4, 10-14, 21,22

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
23. Februar 2000	17.03.00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31–70) 340–3016	Mennessier, T

2

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/01350

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KURUCZ I ET AL: "Retargeting of CTL by an efficiently refolded bispecific single-chain Fv dimer produced in bacteria." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1995 MAY 1) 154 (9) 4576-82. , XP000872833 das ganze Dokument	1,4,5, 10-14, 21,22
X	DE JONGE J ET AL: "Production and characterization of bispecific single-chain antibody fragments." MOLECULAR IMMUNOLOGY, (1995 DEC) 32 (17-18) 1405-12. , XP000872314 das ganze Dokument	1,4,5, 10-14, 21,22
A	COLOMA M J ET AL: "Design and production of novel tetravalent bispecific antibodie 'see comments!." NATURE BIOTECHNOLOGY, (1997 FEB) 15 (2) 159-63. , XP000647731 Seite 159 -Seite 160	1-22
T	KIPRIYANOV S M ET AL: "Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, (1999 OCT 15) 293 (1) 41-56. , XP002131382 das ganze Dokument	1-22

2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/01350

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. [X] Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

2. [] Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. [] Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. [] Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. [] Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. [] Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. [] Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

[] Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

[] Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 99/01350

WEITERE ANGABEN PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 21 und 22 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlischen/tierischen Körpers vorgenommen wird, bzw auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen des multivalenten Fv-Antikörper-Konstruktes.